Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale,, n. 4 del 5 gennaio 1980

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Sabato, 5 gennaio 1980 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE DELLE LEGGI E DECRETI - CENTRALINO 65101
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI, 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 8508

DECRETO MINISTERIALE 29 ottobre 1979.

Approvazione di "Metodi ufficiali di analisi dei cereali,, - Supplemento n. 2.

LEGGI E DECRETI

DECRETO MINISTERIALE 29 ottobre 1979.

Approvazione di « Metodi ufficiali di analisi dei cereali » - Supplemento n. 2.

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELLE FINANZE, DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO E DELLA SANITA'

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari, e l'art. 108 del relativo regolamento di esecuzione, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nei citati regio decreto-legge e successivo regolamento dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati, con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle Finanze e della Sanità;

Visto il decreto ministeriale 23 settembre 1978, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 23 del 24 gennaio 1979, concernente la istituzione della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi relativi ai prodotti agrari e sostanze di uso agrario;

Visto il decreto ministeriale 21 settembre 1967, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 285 del 15 novembre 1967, con il quale sono stati approvati i metodi ufficiali di analisi dei cereali;

Visto il decreto ministeriale 18 settembre 1974, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 254 del 30 settembre 1974, con il quale è stato approvato il supplemento n. 1 ai metodi ufficiali di analisi dei cereali, approvati con il citato decreto ministeriale 21 settembre 1967;

Ritenuta la necessità di modificare il metodo ufficiale di analisi di cui al supplemento n. 1 (riconoscimento e dosaggio di sfarinati di grano tenero nelle semole e nelle paste alimentari mediante metodo elettroforetico) al fine di renderlo di più pratica applicazione;

Ritenuto, altresì, necessario che oltre il metodo innanzi indicato, venga ufficializzato un secondo metodo avente lo stesso campo di applicazione, ma basato su tecniche analitiche diverse, per evitare stasi operative causate dall'eventuale impossibilità di reperire i materiali necessari alla esecuzione di uno dei metodi stessi;

Considerato che la commissione - sottocommissione per i cereali - di cui al citato decreto ministeriale 23 settembre 1978, ha espresso parere favorevole all'ufficializzazione dei metodi riportati in allegato al presente decreto;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i « Metodi ufficiali di analisi dei cereali » descritti nel supplemento n. 2 del quale un originale, debitamente vistato dal Ministro dell'agricoltura e delle foreste, è allegato al presente decreto.

Art. 2.

E' abrogato il decreto ministeriale 18 settembre 1974 con il quale è stato approvato il metodo di analisi descritto nel supplemento n. 1 ai metodi ufficiali di analisi dei cereali.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 29 ottobre 1979

Il Ministro delle finanze
REVIGLIO

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
MARCORA

Il Ministro della sanità
ALTISSIMO

Il Ministro dell'industria, commercio ed artigianato
BISAGLIA

METODI UFFICIALI DI ANALISI DEI CEREALI

Supplemento n. 2

RICONOSCIMENTO E DOSAGGIO DEGLI SFARINATI DI FRUMENTO TENERO NEGLI SFARINATI DI FRUMENTO DURO E NELLE PASTE ALIMENTARI MEDIANTE FOCALIZZAZIONE IONICA

1) *Principio del metodo.*

1.1. Estraendo opportunamente un gruppo di proteine solubili da frumento o sfarinati o paste alimentari e sottoponendolo a separazione elettroforetica per focalizzazione ionica su strato sottile, si ottengono tracciati diversi a seconda che l'estratto derivi da *Triticum Durum* (frumento duro) o *Triticum Aestivum* (frumento tenero). Tali differenze permettono il riconoscimento delle due specie di cereali sia separatamente che in loro eventuali miscele.

1.2. Nel tracciato ottenuto a partire da prodotti di grano tenero compaiono due frazioni a pH isoelettrico più basico, assenti nel tracciato relativo a prodotti di frumento duro. Tali frazioni, indicate « A » e « B », derivano dal genoma AABBDD caratteristico del *Triticum Aestivum* e sono presenti in quantità notevolmente costante nelle diverse varietà di questa specie. Ciò permette sia il riconoscimento che il dosaggio degli sfarinati di frumento tenero in prodotti a base di frumento duro.

1.3. La determinazione quantitativa viene condotta confrontando il tracciato del campione sottoposto ad analisi con i tracciati di miscele di sfarinati o di paste standard ottenuti sullo stesso supporto.

2) *Apparecchiatura.*

2.1. Cilindri graduati da 10, 25 e 100 ml.

2.2. Palloni tarati da 100, 250 e 1000 ml.

2.3. Bicchieri da 25, 100 e 400 ml.

2.4. Beute da 100 ml.

2.5. Pipette graduate da 5 ml.

2.6. Micropipette da 10 e 25 µl.

2.7. Bacchettine di vetro con diametro di circa 3 mm.

2.8. Vaschetta da almeno 200×300 mm di lato.

2.9. Rettangolini di carta Whatman N 3 di 10×5 mm.

2.10. Striscie di carta bibula 250×5×2 mm.

2.11. Bisturi o lametta.

2.12. Macinino elettrico.

2.13. Agitatore elettromagnetico rotante ed ancorine in teflon.

2.14. Bilancia analitica.

2.15. pHmetro.

2.16. Centrifuga capace di raggiungere almeno 4500×g e con rotore per provette da 50 ml e da 15 ml.

2.17. Apparecchiatura per elettroforesi su piastra orizzontale refrigerata, con alimentatore di corrente (meglio se a potenza costante) capace di erogare almeno 800 volt e 120 mA.

3) *Reattivi.*

3.1. Solfato ammonico.

3.2. Solfato di magnesio: soluzione acquosa 0,13 M.

3.3. Idrato di sodio: soluzione acquosa 1M.

3.4. Acido fosforico: soluzione acquosa 1M.

3.5. Acido cloridrico: soluzione acquosa 1M.

3.6. Urea: soluzione acquosa 3M.

3.7. Acido tricloracetico: soluzione acquosa al 12% (P/V).

3.8. Olio di vaselina.

3.9. Alcool etilico circa al 95% (anche denaturato).

3.10. Lastre di gel di poliacrilammide aventi le seguenti caratteristiche: 5% acrilammide (P/V); 0,15% N, N' metilenbis acrilammide (P/V); 2,4% ampholine R (V/V) con gradiente di pH da 3,5 a 9,5; catalizzatore; acqua distillata a 100 ml. Dimensioni del gel: 245×110×1 mm. Questi gel sono reperibili già pronti in commercio, ma possono essere ottenuti in laboratorio partendo dai reattivi per elettroforesi.

3.11. Standards di confronto.

3.11.1. Paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%).

3.11.2. Sfarinati a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%), preparati al momento dell'uso nel modo seguente:

0%: g 5,00 di sfarinati di frumento duro;
2%: g 4,90 di sfarinati di frumento duro + g 0,10 di frumento tenero;
7%: g 4,65 di sfarinati di frumento duro + g 0,35 di frumento tenero;
15%: g 4,25 di sfarinati di frumento duro + g 0,75 di frumento tenero.

Tutti i reattivi, se non altrimenti indicato, devono essere puri per analisi.

4) *Modo di operare.*

4.1. Estrazione delle proteine specifiche.

4.1.1. Preparare al momento dell'uso una soluzione acquosa di solfato ammonico 3M e correggere il pH a 4,6 con alcune gocce di acido cloridrico 2M.

4.1.2. Preparare al momento dell'uso la soluzione di estrazione miscelando 200 ml della soluzione di solfato di magnesio (3.2.) con 73 ml della soluzione di solfato ammonico (4.1.1.); aggiustare il pH finale a 3,15 con acido cloridrico 2M.

4.1.3. Addizionare 5 g di prodotto finemente macinato (con macinino trituratore) in beuta da 100 ml, con 20 ml della soluzione di estrazione (4.1.2.) e disperdere uniformemente.
In tali condizioni, la miscela di prodotto macinato e soluzione salina deve avere un pH compreso fra 4,5 e 4,9.

4.1.4. Mantenere in estrazione per almeno 30 min. agitando ogni tanto manualmente.

4.1.5. Centrifugare la miscela di macinato e soluzione salina in provetta da 50 ml in condizioni che possono essere comprese fra 4500 × g per 30 min. e 30.000 × g per 5 min. in funzione della centrifuga disponibile. La temperatura di centrifugazione è quella ambiente.
Tenere presente che la temperatura della soluzione in centrifugazione non deve comunque superare 30°C; nel caso si applichi un numero elevato di accelerazioni di gravità (g) occorre disporre di un adeguato sistema di raffreddamento.

4.1.6. Trasferire 10 ml del surnatante in un bicchiere da 25 ml ed aggiungere, sotto agitazione mediante agitatore elettromagnetico e ancorina in teflon, 2,25 ml della soluzione di solfato ammonico (4.1.1.).

4.1.7. Lasciare riposare a temperatura ambiente per almeno 15 min.

4.1.8. Trasferire in provetta da 15 ml e centrifugare nelle condizioni di cui al punto 4.1.5.

4.1.9. Scartare il surnatante ed asciugare la parete interna della provetta aiutandosi con una bacchetta di vetro e un fazzoletto di carta, facendo attenzione a non asportare il precipitato (che può essere depositato in parte sulle pareti). Quest'ultimo, contenente il gruppo di proteine solubili specifiche, può essere sottoposto immediatamente a separazione elettroforetica.

4.2. Separazione elettroforetica in focalizzazione ionica.

4.2.1. Attivare il sistema refrigerante dell'apparecchiatura elettroforetica: la temperatura ottimale della piastra è di 10°C.

4.2.2. Disperdere il precipitato ottenuto al punto 4.1.9. in 20÷40 μl di soluzione di urea 3M (3.6.); si utilizzeranno volumi di soluzione grosso modo proporzionali alla quantità di precipitato: normalmente si usano 25 μl.

4.2.3. Cospargere di vaselina la piastra refrigerante della apparecchiatura e sistemare su di essa il gel di poliacrilammide evitando la formazione di bolle d'aria.

4.2.4. Porre sul gel di poliacrilammide i rettangolini di carta (2.9.) come indicato nella fig. 1.
Poichè ogni rettangolino di carta è utilizzato per la deposizione di un campione, è chiaro che si possono effettuare contemporaneamente fino a 24 separazioni per un gel lungo 245 mm. Se il numero di campioni da esaminare è inferiore, si utilizza solo una parte del gel tagliato parallelamente al lato minore. Il gel non utilizzato può essere conservato in frigorifero a 4°C per più giorni.

4.2.5. Depositare e far assorbire circa 10 μl della soluzione del campione, di cui al punto 4.2.2., sul rettangolino di carta già posizionato.

4.2.6. Imbibire uniformemente due striscie di carta (2.10.): una con soluzione di idrato di sodio (3.3.) e l'altra con soluzione di acido fosforico (3.4.); pressarle fra due fogli di carta da filtro per evitare una eccessiva imbibizione.
Porre le due striscie sul gel come indicato in fig. 1: quella imbibita con idrato di sodio all'estremo catodico, quella imbibita con acido fosforico all'estremo anodico.

4.2.7. Sistemare gli elettrodi della cella in corrispondenza delle striscie di carta.
Disponendo di un alimentatore a potenza costante, avviare la corsa elettroforetica applicando 0,75 watt per ogni cm di fronte del gel (per un gel intero di 245 mm la potenza sarà pertanto di 18 watt). In queste condizioni la corsa elettroforetica e la stabilizzazione delle proteine al loro pH isoelettrico è ultimata in circa 105 min.
Disponendo di un alimentatore a corrente costante procedere come segue: applicare 4 mA per ogni cm di fronte del gel (per un gel intero di 245 mm applicare 100 mA), a cui corrisponde una tensione di circa 300 volt, ed iniziare la corsa elettroforetica in condizioni di corrente costante. Quando la tensione raggiunge il valore di 800 volt, passare a condizioni di voltaggio costante fino al termine della corsa elettroforetica (circa 105 min.).

4.3. Rivelazione delle frazioni proteiche.

4.3.1. Asportare con la lametta la parte del gel immediatamente sottostante le striscie di carta e le striscie stesse. Staccare il gel dalla piastra refrigerante e togliere la vaselina dalla parte inferiore del gel utilizzando un fazzoletto di carta imbevuto di alcool etilico (3.9.).

4.3.2. Immergere il gel, con la parte superiore (superficie di deposizione) verso l'alto in una vaschetta contenente una soluzione di acido tricloro acetico (3.7.). Dopo 2-5 minuti vengono evidenziate le frazioni proteiche che appaiono bianche nel gel rimasto trasparente ed incolore.

4.3.3. Ricoprire la parte superiore del gel con un foglio di celluloide (o altro materiale trasparente) e sigillare i lati perimetrali con nastro adesivo.
Se tenuto al buio, il gel può essere così conservato per alcuni mesi.
È preferibile, per una più lunga conservazione dei risultati, fotografare il gel con lùce trasversa e su fondo nero.

5) *Interpretazione qualitativa e quantitativa dei risultati.*

5.1. Per la valutazione dei risultati è indispensabile condurre, parallelamente ai campioni incogniti e sullo stesso supporto determinazioni su campioni di riferimento standard.

Utilizzare, nel caso di analisi di sfarinati, miscele di sfarinati a contenuto noto e crescente di frumento tenero 0, 2, 7 e 15%. Preparare al momento dell'analisi 5 g di campione standard ed estrarli in toto.

Utilizzare, nel caso di analisi di paste alimentari campioni di pasta a contenuto noto e crescente di frumento tenero: 0, 2, 7 e 15%.

I campioni standard vanno analizzati come indicato al punto 4.

5.2. Nella fig. 2 vengono riportati i tracciati relativi a miscele standard di sfarinati di frumento duro e tenero.

La parte del tracciato che interessa per l'interpretazione qualitativa e quantitativa dei risultati è quella compresa fra la zona di deposizione (rettangolini di carta) e la frazione 1 caratteristica del frumento duro. In questa zona compaiono le frazioni A e B caratteristiche del frumento tenero (1.2.), assenti nel tracciato relativo ai prodotti di solo frumento duro.

La comparsa nel tracciato di tali bande è pertanto indice di presenza di frumento tenero: per piccole percentuali in frumento tenero compare solo la banda B, per percentuali maggiori anche la banda A. Esiste anche una terza proteina specifica del frumento tenero, indicata in fig. 2 con C ed a pH isoelettrico notevolmente più acido.

5.3. La valutazione quantitativa dei risultati viene condotta confrontando il tracciato del campione incognito con quelli dei campioni standard evidenziati sullo stesso gel.

Il criterio di confronto è quello di raffrontare la intensità delle bande A e B specifiche del frumento tenero e della banda 1 specifica del frumento duro con l'intensità delle medesime bande presenti nei tracciati dei campioni standard. La valutazione quantitativa sarà tanto più accurata quanto più l'intensità di queste bande si avvicinerà all'intensità delle bande di uno dei campioni standard fra quelli della serie deposta. Tenere presente che nel caso di paste alimentari si può avere lo sdoppiamento della banda B e della banda 1: ciò non modifica il criterio di valutazione quantitativa.

6) *Errore del metodo e campo di applicazione.*

6.1. Il metodo, che sotto il profilo qualitativo, evidenzia con certezza contenuti anche minimi di frumento tenero, dà risultati certi e ripetibili dal punto di vista quantitativo per percentuali di frumento tenero, presenti nel campione non inferiori al 2%.

L'errore è di $\pm$ 1 unità percentuale per valori dal 2% al 15% in frumento tenero. Per percentuali superiori l'errore è maggiore.

6.2. Il metodo è applicabile agli sfarinati di grano duro, alle paste alimentari, alle paste all'uovo ed alle paste speciali.

7) *Standards di confronto.*

7.1. Gli standards di paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero sono preparati sotto il controllo degli Istituti delegati alla repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei prodotti agrari e delle sostanze di uso agrario per il Ministero dell'agricoltura e delle foreste, dell'Istituto superiore di sanità per il Ministero della sanità, del Laboratorio centrale delle dogane e I.I., per il Ministero delle finanze ed inoltre di un rappresentante del Ministero dell'industria, commercio ed artigianato, dell'Unione italiana dei laboratori provinciali e dell'Istituto nazionale della nutrizione.

I campioni di standards di paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero e di quello di sfarinato di frumento duro impiegato per la preparazione degli stessi sono conservati ed inviati, a chi ne faccia richiesta a cura del Laboratorio chimico provinciale di Pescara - Via G. Marconi, 51.

Nota: L'adozione del presente metodo deve essere specificata sul certificato di analisi.

Fig. 1. — Schema di sistemazione sulla piastra di policrilammide dei rettangoli di deposizione e delle striscie agli elettrodi.
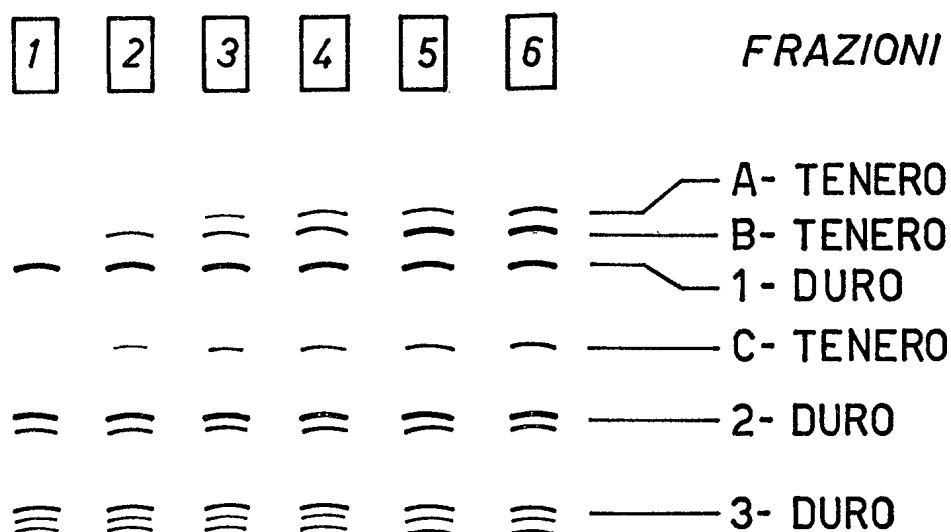
Fig. 2. — Tracciati elettroforetici di miscele standard di sfarinati di grano duro e grano tenero.

Tracciato N. 1 100% grano duro
Tracciato N. 2 1% grano tenero
Tracciato N. 3 3% grano tenero
Tracciato N. 4 7% grano tenero
Tracciato N. 5 10% grano tenero
Tracciato N. 6 15% grano tenero

BIBLIOGRAFIA

1) Resmini P., De Bernardi G. - Tecnica Molitoria, 27:10, 97 (1976).

2) Resmini P., De Bernardi G. - Tecnica Molitoria, 28:9, 139 (1977).

3) Cubadda R. - Scienza e Tecnologia degli Alimenti, 6, 363 (1973).

RICONOSCIMENTO E DOSAGGIO DEGLI SFARINATI DI FRUMENTO TENERO NEGLI SFARINATI DI FRUMENTO DURO E NELLE PASTE ALIMENTARI MEDIANTE METODO IMMUNOCHIMICO.

1) *Principio del metodo.*

1.1. In opportune condizioni è possibile estrarre dal frumento tenero (*Triticum aestivum*), da sfarinati di frumento duro addizionati con sfarinati di frumento tenero e da paste preparate con aggiunta di frumento tenero, una frazione proteica specifica del frumento tenero, che permette di rivelarne la presenza e determinarne la percentuale nei campioni in esame.

1.2. Il metodo immunochimico per il dosaggio degli sfarinati di frumento tenero negli sfarinati di frumento duro e paste alimentari è fondato sulla reazione di immunoprecipitazione in gel di agarosio che si verifica quando la frazione proteica specifica del frumento tenero, contenuta nell'estratto salino di sfarinati o paste alimentari, viene messa a contatto con un siero specifico anti-frumento tenero. Tale frazione proteica deriva dal genoma AABBDD caratteristico del *Triticum aestivum* ed è presente in quantità notevolmente costante nelle diverse varietà di questa specie.

1.3. Gli estratti ottenuti da sfarinati di frumento duro e da paste alimentari preparate esclusivamente con frumento duro (*Triticum durum*) non danno alcuna reazione di immunoprecipitazione con il siero anti-frumento tenero. Qualora invece siano presenti anche piccole quantità di frumento tenero si ottiene, intorno al pozzetto di deposizione dell'estratto del campione in esame, un cerchio di precipitazione il cui quadrato del diametro è direttamente proporzionale, in un certo intervallo, alla quantità di frumento tenero presente.

2) *Apparecchiatura.*

2.1. Macinino elettrico.

2.2. Centrifuga da tavolo capace di raggiungere circa 4000 × g, corredata di provette della capacità di ml 10.

2.3. Bacchette di vetro, lunghezza mm 150 ca, diametro mm 4 ca.

2.4. Vetrini da microscopia 75 × 25 mm.

2.5. Pennello.

2.6. Stufa a secco termoregolabile.

2.7. Tavolo con bolla di livello.

2.8. Bicchieri della capacità di 25 ml.
2.9. Foratappi a mano, diametro mm 3.
2.10. Pipette Pasteur ricurve.
2.11. Pompa a vuoto.
2.12. Camera umida.
2.13. Microsiringhe della capacità di 25 micro litri.
2.14. Calibro o monoculare ingranditore con scala graduata incorporata (deve essere possibile la misura di 1/10 mm).
2.15. Comune vetreria di laboratorio.

3) *Reattivi.*

3.1. Soluzione acquosa 0,15 M di cloruro di sodio all'1°/₀₀ di sodio-azide.
3.2. Gel di agarosio all'1% in soluzione di cloruro di sodio (3.1.).
3.3. Siero specifico anti-frumento tenero.
3.4. Soluzione di agarosio tamponata preparata come segue:
3.4.1. Sciogliere 0,2 g di agarosio in 10 ml di acqua distillata scaldando con cautela su fiamma diretta (90°C circa).
3.4.2. Preparare un tampone della seguente composizione:
2 amino-2 (Idrossimetil) 1-3
propandiolo (tris) g 43,1
Sale bisodico dell'acido etilendiaminotetracetico (EDTA) g 3,7
Acido borico g 22,0
Acqua distillata q.b. a 1 litro.
3.4.3. Miscelare a caldo la soluzione 3.4.1. con 10 ml di tampone 3.4.2. fino a completa soluzione.
La soluzione di agarosio tamponata così preparata, che gelifica a temperatura ambiente, può essere conservata a 4°C per un mese.
3.5. Standards di confronto.
3.5.1. Paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%).
3.5.2. Sfarinati a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%), preparati al momento dell'uso nel modo seguente:
0%: g 2,00 di sfarinati di frumento duro;
2%: g 1,96 di sfarinati di frumento duro + g 0,04 di frumento tenero;
7%: g 1,86 di sfarinati di frumento duro + g 0,14 di frumento tenero;
15%: g 1,70 di sfarinati di frumento duro + g 0,30 di frumento tenero.
3.6. Soluzione acquosa all'1% di acido tannico (p/v).
3.7. Soluzione di Blu di Comassie allo 0,1% in una miscela di alcol metilico-acido acetico glaciale-acqua (50:10:40, v/v).
La soluzione si conserva a temperatura ambiente per 15 giorni.
3.8. Soluzione decolorante, costituita da una miscela di alcol metilico-acido acetico glaciale-glicerina-acqua distillata (50:10:10:30, v/v).
Tutti i reattivi devono essere puri per analisi.

4) *Modo di operare.*

4.1. Estrazione della proteina specifica.
4.1.1. Mescolare accuratamente 4 g di pasta, macinata con macinino elettrico (2.1.) e posta in provetta da centrifuga (2.2.), con 5 ml di soluzione di cloruro di sodio (3.1.), aiutandosi con una bacchetta di vetro (2.3.). Per gli sfarinati mescolare 2 g di prodotto con 4 ml della soluzione di cloruro di sodio, seguendo una identica procedura.
4.1.2. Dopo riposo da 6 a 15 ore a temperatura ambiente, centrifugare la sospensione per 15 minuti a circa 4000 × g (2.2.). Usare il surnatante direttamente per l'analisi di immunodiffusione radiale; esso può essere conservato a 5°C per una settimana.
4.2. Preparazione dei vetrini con miscela di siero-agarosio per l'analisi di immunodiffusione radiale.
4.2.1. Sgrassare accuratamente con detergente, lavare con acqua distillata ed asciugare con carta da filtro i vetrini da microscopia (2.4.). Depositare con un pennello (2.5.) sui vetrini un sottile strato di agarosio (3.2.) preventivamente fluidificato a caldo. Essiccare i vetrini così preparati in stufa (2.6.) a 80°C e quindi lasciare raffreddare a temperatura ambiente.
4.2.2. Porre i vetrini su un tavolo di livellamento (2.7.) perfettamente orizzontale.
4.2.3. Aggiungere a 1 ml di siero specifico anti-frumento tenero (3.3.), posto in un bicchiere da ml 25 (2.8.), 2,2 ml di agarosio temponato (3.4.) fluidificato a temperatura non superiore a 60°C (50° - 56°C) mescolando efficacemente. Versare rapidamente questa miscela su un vetrino in modo che si distribuisca uniformemente.
4.2.4. Lasciare raffreddare lentamente a temperatura ambiente i vetrini così stratificati in modo da ottenere la gelificazione dello strato siero-agarosio.
4.2.5. Incidere con un foratappi (2.9.) lo strato di siero-agarosio gelificato per ricavarne 8 pozzetti secondo la disposizione riportata in fig. 1. Asportare l'agarosio inciso mediante pipetta Pasteur (2.10.) ricurva collegata con una pompa a vuoto (2.11.), in modo da avere la formazione di pozzetti nello strato di agarosio. Se questi preparati non sono usati immediatamente possono essere conservati per alcuni giorni in camera umida (2.12.).
4.3. Procedimento per l'analisi di immunodiffusione radiale.
4.3.1. Accertarsi che i pozzetti di deposizione non contengano acqua di condensa: in caso positivo asportarla con pipetta Pasteur collegata con la pompa a vuoto. Utilizzare gli 8 pozzetti per l'analisi in doppio di due campioni di pasta o di sfarinato e, in singolo, dei quattro standards di confronto (3.5.). Deporre 10 microlitri degli estratti, mediante microsiringa (2.13.) nel corrispondente pozzetto; trasferire i vetrini in posizione perfettamente orizzontale in camera umida e lasciarveli al minimo 24 ore per consentire alle soluzioni di diffondere nello strato di agarosio.

4.3.2. Sottoporre i vetrini ad una serie di lavaggi con la soluzione di cloruro di sodio, cambiando la soluzione di lavaggio 3 volte al giorno per non meno di 3 giorni. Un lavaggio incompleto dei vetrini rende impossibile l'osservazione degli anelli di precipitazione dopo la colorazione.

4.3.3. Procedere al fissaggio dei precipitati immergendo per 30 minuti i vetrini in soluzione di acido tannico (3.6.). Trasferire i vetrini in acqua distillata per 2-3 ore ed essiccarli in stufa a 37°C.

4.3.4. Colorare i vetrini tenendoli immersi per 10 minuti nella soluzione di Blu di Comassie (3.7.).

4.3.5. Decolorare i preparati immergendoli nella soluzione decolorante (3.8.). La soluzione decolorante va cambiata ripetutamente sino ad ottenere degli anelli di precipitazione colorati su fondo incolore. Seccare a temperatura ambiente.

5) *Interpretazione qualitativa e quantitativa dei risultati.*

5.1. Per la valutazione quantitativa dei risultati è indispensabile condurre parallelamente ai campioni incogniti e sullo stesso vetrino l'analisi di campioni di riferimento standard (vedi 4.3.1.).
Utilizzare, nel caso di analisi di sfarinati, miscele di sfarinati a contenuto noto e crescente di frumento tenero (0, 2, 7, 15%) (3.5.2.).
Utilizzare, nel caso di analisi di paste alimentari, g 4 di campioni di pasta macinata a contenuto noto e crescente di frumento tenero (0, 2, 7, 15%) (3.5.1.).

5.2. La presenza, attorno ai pozzetti di deposizione, di un anello di precipitazione è indice della presenza nel campione deposto, di sfarinati di frumento tenero.

5.3. Per l'interpretazione quantitativa è necessario tracciare una retta di taratura che correli il quadrato del diametro dei cerchi di precipitazione con la percentuale di frumento tenero.

5.3.1. Misurare con uno strumento in grado di apprezzare 1/10 di mm (2.14.) il diametro dei cerchi di precipitazione ottenuti con i campioni standards. Costruire in un sistema di coordinate cartesiane, dove in ascisse sono posti i quadrati dei diametri ed in ordinate le percentuali di frumento tenero, una retta di taratura come riportato nella fig. 2.

5.3.2. Determinare la percentuale di frumento tenero nei campioni incogniti misurando i diametri dei rispettivi cerchi di precipitazione e facendo riferimento alla retta di taratura (5.3.1.) ottenuta con i campioni standards analizzati sul medesimo vetrino con i campioni incogniti. Poichè, per percentuali di frumento tenero superiori al 20% non vi è relazione lineare tra il quadrato del diametro del cerchio di precipitazione e la percentuale di frumento tenero, per campioni che abbiano rivelato un contenuto di frumento tenero superiore al 20% sarà necessario diluire opportunamente l'estratto con la soluzione di cloruro di sodio e sottoporlo di nuovo all'analisi di immunodiffusione radiale.

6) *Errore del metodo e campo di applicazione.*

6.1. Il metodo, che sotto il profilo qualitativo, evidenzia con certezza contenuti anche minimi di frumento tenero, dà risultati certi e ripetibili dal punto di vista quantitativo, per percentuali di frumento tenero presenti nel campione non inferiori al 2%.
L'errore è di $\pm$ 1 unità percentuale per valori dal 2% al 15% di frumento tenero.

6.2. Il metodo è applicabile agli sfarinati, alle paste alimentari, alle paste all'uovo ed alle paste speciali.

7) *Standard di confronto.*

7.1. Gli standards di paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero sono preparati sotto il controllo degli Istituti delegati alla repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei prodotti agrari e sostanze di uso agrario per il Ministero dell'agricoltura e delle foreste, dell'Istituto superiore di sanità, per il Ministero della sanità, del Laboratorio centrale delle dogane e I.I., per il Ministero delle finanze ed inoltre di un rappresentante del Ministero dell'industria, commercio ed artigianato, dell'Unione italiana dei laboratori provinciali e dell'Istituto nazionale della nutrizione.
I campioni di standards di paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero e di quello di sfarinato di frumento duro impiegato per la preparazione degli stessi sono conservati ed inviati, a chi ne faccia richiesta a cura del laboratorio chimico provinciale di Pescara - Via G. Marconi, 51.

Nota: L'adozione del presente metodo deve essere specificata sul certificato di analisi.

Fig. 1. — (sopra). Disposizione dei pozzetti nello strato di siero-agarosio gelificato.
— (sotto). Analisi di immunodiffusione radiale di campioni di paste alimentari standards a contenuto noto di frumento tenero (A, 0%; B, 2%; C, 7%; D, 15%) e di paste commerciali (E, F).
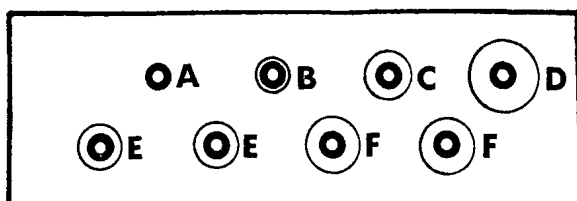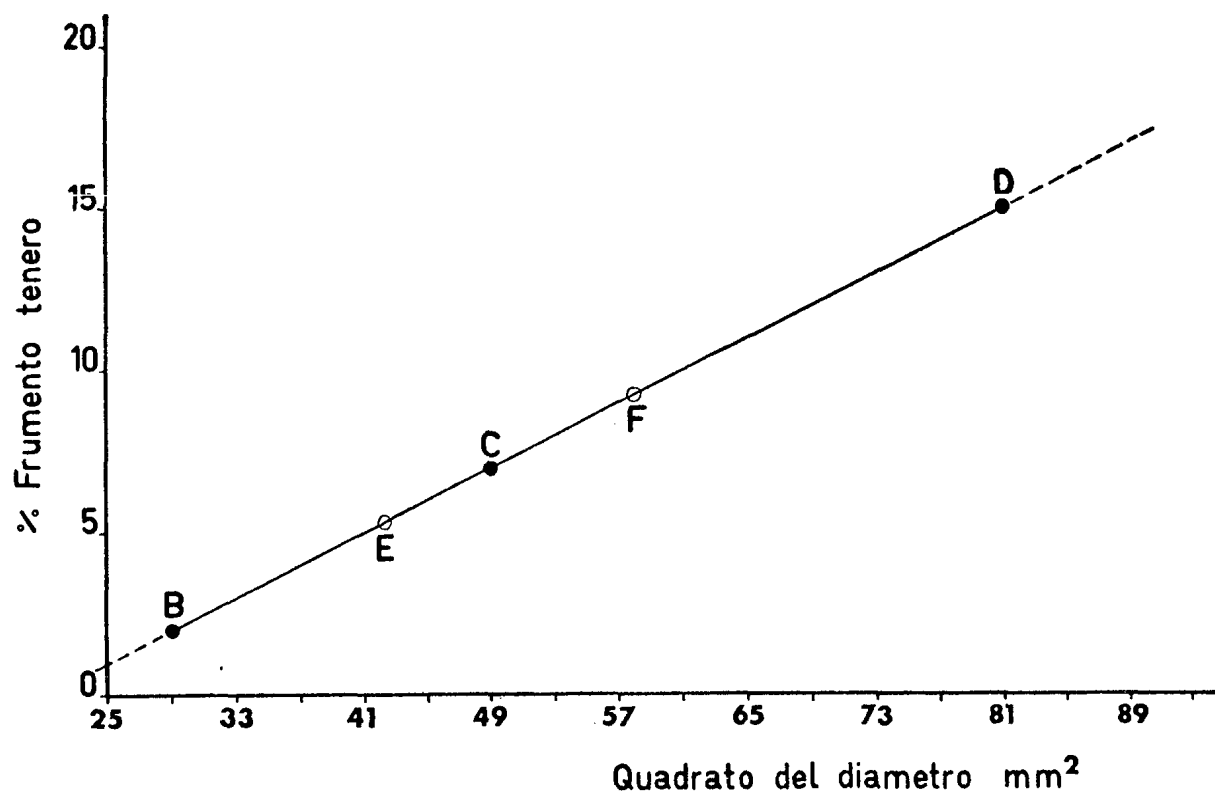
Fig. 2. — Retta di taratura costruita con gli standards A, B, C, D, e dosaggio del frumento tenero in due paste commerciali (E, F)

BIBLIOGRAFIA

1) Cantagalli P. Piazzi S.E., Sordi-Galli S. : Tecnica Molitoria 20, 79 (1969);

2) Piazzi S.E., Cantagalli P. : Cereal Chemistry 46, 642 (1969);

3) Bracciali A., Cantagalli P., Piazzi S.E., Sordi S. : Bollettino Laboratori Chimici Provinciali 25, 232, (1974).

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
MARCORA

(11303)

FRANCESCO NIGRO, *direttore reggente* — DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*

(9651185/4) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.